

25X1

Page Denied

Министерство Здравоохранения СССР

ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ

Директор В. П. ЛЕБЕДЕВА

На правах рукописи

Ю. З. ГЕНДОН

ЦЕЛЛОФАНОВЫЕ БОТУЛИНИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ
И АНАТОКСИНЫ ТИПА «А» И ПРОТИВОБОТУЛИ-
НИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДАМИ
ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ДИФФУЗИОН-
НОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ В АГАРЕ

*Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук*

МОСКВА — 1957

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
СЫВОРОТОК И ВАКЦИН им. Л. А. Тарасевича

Директор института С. И. Диденко
Научный руководитель института
член-корр. АМН проф. Н. Г. Ключева

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
доктор мед. наук, проф. Ф. А. Черткова

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ
Доктор мед. наук, проф. М. Н. Синюшина
Кандидат мед. наук, доцент В. Р. Соболев

Защита состоится в ЦИУ, г. Москва, пл. Восстания, д. 1/2

« 5 » 1957 г. в час.

Авторефераты разосланы « » 1957 г.

Получение высокоактивных очищенных препаратов для целей активной иммунизации и профилактики бактериальных заболеваний является важной задачей современной иммунологии.

Одним из методов, позволяющих получать нативные высококонцентрированные антигены с незначительной примесью балластных белковых веществ, является способ культивирования в целлофановых мешках.

При получении высокоактивных очищенных препаратов необходимо знать их антигенную и фракционную структуру, знать какие фракции являются полноценными, а какие балластными, что имеет большое значение при выборе наиболее рациональных способов очистки и концентрации.

В последние годы появились новые широкодоступные методы изучения фракционной структуры токсинов и антитоксинов. Такими методами являются зональный электрофорез, диффузионная преципитация в агаре и сочетание этих двух методов — электрофорезопреципитация (иммуоэлектрофорез).

Возможность получения активных целлофановых токсинов, а также значение этих методов при детальном исследовании антигенной и фракционной структуры токсинов и антитоксинов особенно ярко может быть показано на модели ботулинического токсина, являющегося наиболее сильным из всех известных бактериальных ядов.

Основной задачей нашего исследования являлось получение целлофановых ботулинических токсинов и антитоксинов типа «А», их сравнительное изучение с обычными токсинами и анатоксинами, а также исследование антигенной и фракционной структуры ботулинических токсинов и антитоксинов типа «А» с целью выявления наиболее ценных фракций.

В начале исследования была отработана методика культивирования в целлофановых мешках, а также изу-

чены те факторы, которые могли в той или иной степени влиять на рост и токсинообразование ботулинических бацилл.

Методика выращивания в целлофане вкратце заключается в следующем: внутри стеклянной бутылки помещают целлофановую трубку, укрепленную на специальной стеклянno-ватно-марлевой пробке. Целлофановый мешок наполняют физиологическим раствором, а в колбу наливают питательную среду. После стерилизации проводят засев бактерий в целлофановый мешок и всю систему помещают в термостат. Опыты проводили с баци. ботулинической типа «А», штамм № 98. Питательной средой в большинстве опытов служил печеночный бульон с 0,5% глюкозы, рН 7,2.

При отработке методики было проведено сравнительное изучение влияния на рост и токсинообразование в целлофановых мешках нескольких способов укрепления, а также сортов целлофана, различных питательных сред, культивирования в аэробных и анаэробных условиях и при различных температурах, были выявлены оптимальные соотношения физиологического раствора и питательной среды, исследовано влияние метода стерилизации физиологического раствора, а также избран наиболее удобный способ забора токسينа из целлофанового мешка и освобождения токسينа от бактериальных клеток.

Было обнаружено, что количество микробных тел, образующихся при культивировании в целлофановых мешках, в 7—8 раз больше, чем при выращивании в обычных условиях (500—700 млн/мл при обычном выращивании и 4—5 млрд/мл при культивировании в целлофане).

При изучении динамики токсинообразования было обнаружено, что максимум токсинообразования при обычных условиях культивирования приходится на 5—6 сутки, в то время как при выращивании в целлофановых мешках на 8—9 сутки. Было отмечено, что максимум токсинообразования и аутолиза бактерий совпадали по времени. Повидимому, основная масса ботулинического экзотоксина поступала в окружающую среду лишь после гибели и аутолиза бактериальных клеток. В процессе культивирования бактерий имело место постепенное снижение величины рН, принимающее наиболее низкое значение ко времени максимума токсинообразования. При этом, в целлофановых мешках понижение рН происходило в мень-

шей степени, чем при обычном культивировании (рН 6,8 в целлофановых мешках, 5,8—6,0 при обычных условиях культивирования).

Проведенные исследования 55 серий целлофановых и обычных токсинов показали, что целлофановые токсины по количеству ДЛМ/мл в 10—40 раз, чаще всего в 20 раз, активнее обычных токсинов и содержат от 1.000.000 до 6.000.000 ДЛМ/мл против 60.000—200.000 ДЛМ/мл обычных токсинов. Питательная среда, окружавшая целлофановый мешок, совершенно не содержала токсина. По количеству опытных доз/мл целлофановые токсины были в 10—40 раз, чаще всего в 20—30 раз, активнее обычных и содержали от 2.000 до 10.000 опытных доз/мл против 100—300 опытных доз/мл обычных токсинов.

Целлофановые токсины обладали высокой флокулирующей активностью и флокулировали через 25—35 минут после начала опыта, в то время как у обычных токсинов вообще не удалось наблюдать флокуляции при тех же условиях опыта.

В реакции коагпреципитации целлофановые токсины образовывали кольцо при разведении в 14—16 раз, в то время как обычные токсины давали кольцо только в неразведенном виде. В целлофановых токсинах содержалось, примерно, в два раза меньше аминокислот и общего азота по сравнению с обычными. При пересчете содержания ДЛМ/мг азота целлофановые токсины оказались в 37 раз чище обычных.

Изучение причин увеличения роста и токсинообразования ботулинических бактерий при культивировании в целлофановых мешках показало, что это увеличение связано со свойствами целлофана с одной стороны как диализующей мембраны, обеспечивающей постоянный и непрерывный приток низкомолекулярных белковых фракций питательной среды, наиболее ценных для роста и токсинообразования и отток продуктов метаболизма бактерий, а с другой стороны, как адсорбирующей поверхности, на которой задерживаются различные вещества, вредно действующие на рост и токсинообразование микробов.

При изучении стабильности токсинов при хранении на протяжении 12 месяцев в холодильнике без консерванта целлофановые токсины оказались менее стабильными по сравнению с обычными. Возможно, что меньшая стабильность целлофановых ботулинических токсинов связана

с более высоким значением рН (6,8 у целлюфановых токенинов, 5,8 — 6,0 у обычных).

Сравнительное изучение концентрации целлюфановых и обычных токенинов методами вакуумного высушивания, диализом против глицерина, ультрафильтрацией, высаживанием сернокислым аммонием и осаждением трихлоруксусной кислотой показало, что процессы концентрации обычных и целлюфановых токенинов идут, примерно, одинаково. При этом, в силу того, что исходные целлюфановые токенины были высокоактивны, при их концентрации удается получить препараты с гораздо более высоким содержанием смертельных доз, чем при концентрации обычных токенинов.

Получение целлюфановых токенинов представляет значительную экономическую выгоду. Так, при культивировании в целлюфане можно получить вдвое больше смертельных доз, чем на том же количестве питательной среды в случае использования ее при обычном выращивании. Кроме того, питательную среду, на которой был получен целлюфановый токенин, можно использовать еще раз для получения токенина при обычном культивировании. В наших опытах на такой среде образовался ботулинический токенин типа «А», содержащий 30.000 ДЦМ/мл.

Следующим разделом исследования являлось сравнительное изучение антигенного состава целлюфановых и обычных ботулинических токенинов типа «А» и антитокенических противоботулинических сывороток типа «А» методом диффузионной преципитации в агаре. Вкратце методика опытов заключалась в следующем: в пробирки, диаметром 5—6 мм, наливали 2 мл 1% агара, смешанного с антитокенической сывороткой. На этот слой насаживали 1 мл нейтрального 1% агара и, после его затвердения, наливали антиген. Пробирки помещали в термостат или оставляли при комнатной температуре и в течение определенного срока наблюдали образование колец преципитации.

Было показано, что для выявления максимального количества антигенных фракций, имеющихся в токенине, необходимо брать токенин в наивысшей концентрации, а соответствующую антисыворотку в оптимальной концентрации, при которой образуется наибольшее число колец преципитации (в наших опытах такими концентрациями оказались 250—500 АЕ/мл сывороточного агара).

В дальнейшем было обнаружено, что количество выявляемых в токсине антигенных фракций зависит от серии токсина, от серии антисыворотки и от метода очистки и концентрации сыворотки и токсина. Наибольшее количество антигенных фракций выявляется при реакции токсина с сыворотками, очищенными и концентрированными методом «Диаферм 3 ИЭМ АМН», несколько меньшее с сыворотками, очищенными и концентрированными методом комбинированного диализа и значительно меньшее с нативными сыворотками.

При изучении антигенного состава полученных токсинов с помощью реакции диффузионной прerinитации в агаре было обнаружено, что в обычных токсинах присутствуют 15 антигенных фракций, из которых одна связана с белками питательной среды. В целлофановых токсинах дифференцировалось 14 антигенных фракций, и отсутствовала фракция, связанная с белками питательной среды. По меньшей мере пять антигенных фракций токсинов являлись балластными, причём количественное содержание этих балластных фракций в целлофановых токсинах было значительно меньшим, чем в обычных.

Изучение изменения антигенных фракций при очистке и концентрации токсинов показало, что осаждение трихлоруксусной кислотой обеспечивает более полное освобождение токсина от инертных антигенных фракций, чем высаливание сернокислым аммонием.

В дальнейшей работе представляло значительный интерес сравнительное изучение фракционного состава белков обычных и целлофановых ботулинических токсинов, а также антиботулинических сывороток и выяснение с какими фракциями токсинов связана основная масса токсигенного начала и какие фракции антисыворотки являются основными носителями антиботулинических и прerinитирующих антител.

Для этого исследования был использован метод электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге. Нами был сконструирован аппарат, пользуясь которым можно было регулярно получать четкое разделение на фракции на отечественных сортах фильтровальной бумаги.

В общих чертах методика электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге заключается в следующем. Полосу фильтровальной бумаги, промочен-

тельно смоченную буферным раствором, помещали в аппарат для электрофореза. На бумагу наносили исследуемый раствор, после чего через всю систему пропускали постоянный электрический ток в течение 6 или 18 часов. После окончания фракционирования бумажку фиксировали высушиванием, окрашивали и изучали качественно и количественно, а также определяли электрофоретическую подвижность.

В первых опытах нами были изучены нормальные сыворотки крови человека, а также лошади, быка, кролика, морской свинки и мыши. Полученные нами данные как в отношении качественного и количественного состава белковых фракций, так и в отношении величин электрофоретической подвижности совпадали с результатами авторов, проводивших фракционирование тех же сывороток в аналитической кювете и на фильтровальной бумаге.

В следующих опытах мы изучили белковые фракции лошадиных антитоксических противоботулинических типа «А» сывороток крови как нативных, так очищенных и концентрированных методом комбинированного анализа и «Диаферм».

Проведенные исследования показали, что в нативных свежеполученных лошадиных антитоксических противоботулинических сыворотках типа «А» дифференцируется альбуминовая, альфа-, бета-, Т- и гамма-глобулиновые фракции. В сыворотках, очищенных и концентрированных методом комбинированного анализа, удаляется, в основном, альбуминовая фракция и дифференцируются альфа-, бета- и гамма-глобулиновые фракции. В сыворотках, очищенных и концентрированных методом «Диаферм», дифференцируются две фракции - основная, с электрофоретической подвижностью $1,62 \times 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ вольт}^{-1} \text{ сек.}^{-1}$, и вторая, значительно меньшая в количественном отношении, с электрофоретической подвижностью $4,24 \times 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ вольт}^{-1} \text{ сек.}^{-1}$. В исследованной нами нативной антисыворотке, хранившейся в течение 12 лет Т-фракция слилась с гамма-глобулинами и дифференцировалась только при двумерном электрофорезе.

Задача следующих исследований состояла в выяснении с какими белковыми фракциями сыворотки крови связаны анитоксины в противоботулинической антисыворотке. Для изучения отдельных фракций мы применили препаративный электрофорез на фильтровальной бумаге.

Эти исследования показали, что в нативных сыворотках основным носителем антитоксина являлась Т-глобулиновая фракция, кроме того, некоторое количество антитоксина имелось в гамма- и бета-глобулиновых фракциях; в сыворотках, очищенных и концентрированных методом комбинированного диализа, антитоксин содержался в гамма-глобулиновой фракции и, в меньшем количестве, в бета-глобулиновой фракции; у сывороток, очищенных и концентрированных методом «Тиаферол», остающаяся масса антитоксина связана с основной фракцией.

Выяснив, какие белковые фракции антисыворотки являются основными носителями антитоксина, нас заинтересовал вопрос, какие фракции обладают прищипывающей активностью. С этой целью мы провели изучение сывороток методом электрофореза преципитации в агаре. При этом методе вначале проводится электрофорез смеси фракционированной сыворотки в агаре, а затем происходит диффузионная преципитация в агаре с антитоксинами, разложенным параллельно им фракционированным антисыворотками. В результате реакции образуются зоны преципитации, причём линия, проведенная из вершины каждой зоны перпендикулярно оси фракционирования, указывает место расположения фракции, из которой диффундировали в преципитацию продукты антитоксина. Проведенные исследования показали, что в противоботулинических антитоксических донативных сыворотках типа «А» прищипывающие антитела содержатся в тех же белковых фракциях, что и антитоксические.

Следующий этап работы был посвящен изучению фракционного состава белков обычных и целлефановых ботулинических токенов типа «А», а также питательной среды, на которой получали токены.

Качественное и количественное изучение фракционного состава белков питательной среды, на которой получали ботулинические токены типа «А», выявило наличие в ней 1 белковых фракций, из которых одна, по-видимому, являлась основным питательным субстратом. Качественное и количественное изучение фракционного состава белков нативных обычных и целлефановых ботулинических токенов типа «А» методом электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге выявило наличие в них пяти белковых фракций, из которых две имеют положительный электрический заряд, а три отрицательный.

В целлофановом токенине преобладала в количественном отношении отрицательно заряженная фракция с наименьшей электрофоретической подвижностью, равной $1,06 \times 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ вольт}^{-1} \text{ сек.}^{-1}$, причём, как показало исследование отдельных фракций токенинов, выделенных с помощью препаративного электрофореза на фильтровальной бумаге, именно эта фракция является основным носителем токенического начала. С помощью электрофореза на фильтровальной бумаге было обнаружено, что при очистке и концентрации целлофановых токенинов происходит более полное удаление балластных фракций и большая концентрация фракции, являющейся основным носителем токенического начала, чем при очистке и концентрации обычных токенинов.

Одним из разделов работы являлось сравнительное изучение фотодинамического действия метиленовой сини на обычные и целлофановые ботулинические токенины типа «А». Проведенные исследования показали, что ботулинические токенины типа «А» полностью обезвреживаются при фотодинамическом действии метиленовой сини и света за 33–37 часов. Фотодинамическое обезвреживание имело место только при комплексном действии метиленовой сини и света в присутствии свободного кислорода. В процессе фотодинамического обезвреживания ботулинических токенинов в значительной степени разрушаются антигенные и, особенно, иммуногенные свойства.

В дальнейшем нас интересовал вопрос о целлофановом анатокенине как антигене для активной иммунизации. В опытах по обезвреживанию токенинов формалином было показано, что целлофановые ботулинические токенины типа «А» полностью обезвреживались при добавлении 0,4% формалина за 14–15 суток, а добавлении 0,1% за 25–30 суток. Для обезвреживания обычных токенинов требовалось, примерно, столько же времени, хотя содержание специфического токенического начала в них было во много раз меньше, чем в целлофановых токенинах.

Целлофановые анатокенины по антигенным свойствам оказались в 5–11 раз, в среднем в 7 раз, активнее обычных токенинов и содержали 320–350 ЕС/мл против 10–60 ЕС/мл обычных.

По содержанию общего и аминного азота целлофановые анатокенины были, примерно, в 2 раза чище обычных.

При расчете содержания ЕС/мг азота, целлофановые анатоксины оказались в 14 раз чище обычных.

Целлофановые анатоксины обладали высокой флокулирующей способностью и флокулировали через 90-115 минут, в то время как обычные анатоксины не флокулировали при тех же условиях опыта.

Иммуногенные свойства анатоксинов были изучены в опытах иммунизации мышей и морских свинок.

Двукратная иммунизация белых мышей нативными анатоксинами показала, что целлофановый нативный анатоксин иммуногеннее обычного.

Морские свинки были иммунизированы одно-, двух-, трёх- и четырёхкратно целлофановыми и обычными анатоксинами, содержащими равное количество ЕС/мг. В этих опытах целлофановые анатоксины оказались в 2-4 раза иммуногеннее обычных.

Адсорбция целлофанового анатоксина на фосфорнокислом алюминии повышала его иммуногенную активность, примерно, в 7-8 раз.

В заключительных опытах мы исследовали с помощью метода электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге количественные изменения в составе белковых фракций сывороток крови мышей и морских свинок, происходящие при иммунизации ботулиническими анатоксинами типа «А».

Нам было обнаружено, что в процессе иммунизации мышей целлофановым ботулиническим анатоксином происходило значительное увеличение гамма-глобулиновой белковой фракции и некоторое увеличение бета-глобулиновой фракции, а при иммунизации морских свинок возрастало содержание гамма-глобулиновой и бета-глобулиновой белковых фракций, при этом, можно отметить некоторую связь между титром анитоксина и возрастанием содержания гамма- и бета-глобулинов. Так, в крови морских свинок, иммунизированных целлофановыми анатоксинами, вызвавшими образование значительного количества анитоксина, увеличение гамма- и бета-глобулинов происходило в большей степени, чем у иммунизированных обычными анатоксинами. Однако, если между содержанием анитоксина в крови морских свинок, иммунизированных указанными видами анатоксинов, была разница в десятки раз, различие между увеличением гамма- и бета-глобулиновых фракций при иммунизации этими анатоксинами

нами не превышало 1,5—2 раз. Повидимому, увеличение глобулиновых фракций в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных обычным анатоксином, в значительной степени происходило за счет неспецифических белковых фракций, которые присутствовали в этом анатоксине в больших количествах и вызвали образование неспецифических антител, в то время как целлофановый анатоксин, белок которого почти целиком является специфическим антигеном, вызывает образование, главным образом, специфических антител.

Таким образом, проведенные исследования показали, что получение ботулинических токсинов типа «А» в целлофановых мешках доступно, экономично и имеет большое практическое значение.

Было выявлено явное преимущество нативных целлофановых анатоксинов типа «А» как препаратов для активной иммунизации по сравнению с анатоксинами, полученными из обычных токсинов. Целлофановые анатоксины могут быть в дальнейшем сконцентрированы и очищены химическими методами, при этом, учитывая, что в целлофановых препаратах преобладает белковая фракция, являющаяся основным носителем токсического начала, можно, повидимому, добиться наиболее полной концентрации именно этой фракции с почти полным удалением балластных фракций. Высокие флокулирующие свойства целлофановых анатоксинов позволяют использовать их в качестве стандартных при титровании антитоксических противоботулинических сывороток.

Получение нами целлофановых токсинов в 15—20 литровых бутылках, показывает, что в настоящее время имеются все предпосылки для технической разработки способа получения целлофановых токсинов и анатоксинов в больших объемах и внедрения этого метода в производственную практику.

Применение методов электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге, препаративного электрофореза, электрофореза в тонком слое, а также диффузионной преципитации в агаре позволило установить ряд закономерностей, имеющих существенное значение в деле получения высококачественных ботулинических токсинов, анатоксинов и антитоксинов типа «А». Использование этих методов для изучения фракционного и антигенного состава токсинов, анатоксинов и антитоксинов,

а также для определения значения каждой отдельной фракции в значительной степени может помочь в решении вопроса о том, каким требованиям должны удовлетворять качественные препараты и какие методы очистки и концентрации антигенов и антител являются наиболее рациональными. Эти методы должны найти широкое применение при изучении других бактериальных препаратов.

В Ы В О Д Ы

1. Методом культивирования в целлофановых мешках получены ботулинические токсины типа «А», которые оказались по содержанию ДЛМ/мл в 20 раз, а по количеству опытных доз/мл в 20—30 раз активнее обычных токсинов. Максимум токсинообразования при культивировании в целлофановых мешках наступает на 2—4 суток позже, чем при выращивании в обычных условиях. Целлофановые токсины обладают высокой флокулирующей способностью. По содержанию общего и аминокислотного азота целлофановые токсины почти вдвое чище обычных. Количество микробных клеток, образующееся при выращивании ботулинических бактерий типа «А» в целлофановых мешках, в 7—8 раз больше, чем при культивировании в обычных условиях.

2. С помощью метода диффузионной преципитации в агаре в обычных ботулинических токсинах типа «А» выявляются 15 антигенных фракций, одна из которых связана с белками питательной среды. В целлофановых токсинах дифференцируются 14 антигенных фракций; в этих токсинах отсутствует антиген, связанный с белками питательной среды. По меньшей мере 5 антигенных фракций токсина из общего числа обнаруженных являются балластными; количественное содержание этих балластных антигенов в целлофановых токсинах значительно меньше, чем в обычных. Количество выявляемых антигенных фракций зависит от серии антисывороток, а также от метода очистки и концентрации.

3. С помощью метода электрофоретического фракционирования на фильтровальной бумаге в пассивных латинских противоботулинических антитоксических типа «А» сыворотках дифференцируется альбуминовая, альфа-, бета-, Т- и гамма-глобулиновые фракции. В сыворотках очищенных и концентрированных методом комбинирован-

ного диализа, выявляются альфа-, бета- и гамма-глобулиновые фракции. В сыворотках, очищенных и концентрированных методом «Диаферм», имеются две фракции: основная, с электрофоретической подвижностью равной $1,62 \times 10^{-5}$ см² вольт⁻¹ сек.⁻¹ и вторая, с электрофоретической подвижностью равной $4,24 \times 10^{-5}$ см² вольт⁻¹ сек.⁻¹. Основным носителем антитоксических антител в нативных сыворотках является Т-глобулиновая фракция, кроме того, некоторая часть антитоксина имеется в гамма- и бета-глобулиновых фракциях; в сыворотках, очищенных и концентрированных методом комбинированного диализа, антитоксические антитела содержатся в гамма-глобулиновой фракции и в меньшем количестве в бета-глобулиновой фракции; у сывороток, очищенных и концентрированных методом «Диаферм», подавляющая масса антитоксина связана с основной фракцией. Преципитирующие антитела в противоботулинических типа «А» сыворотках находятся в тех же белковых фракциях, что и антитоксические.

4. В ботулинических токсинах типа «А» дифференцируются пять белковых фракций, из которых лишь одна является основной носительницей токсического начала. В целлофановых токсинах в количественном отношении преобладает именно эта фракция. При очистке и концентрации целлофановых токсинов происходит более полное удаление балластных фракций и большая концентрация фракции, являющейся основной носительницей токсического начала, чем при очистке и концентрации обычных токсинов.

5. Ботулинические токсины типа «А» полностью обезвреживаются фотодинамическим действием метиленовой сини и света, при этом в значительной степени разрушаются антигенные и, особенно, иммуногенные свойства.

6. Целлофановые ботулинические токсины типа «А» хорошо обезвреживаются формалином. По антигенным свойствам целлофановые анатоксины в 5—11 раз активнее обычных. Целлофановые анатоксины обладают высокой флокулирующей способностью. По содержанию общего и аминного азота целлофановые анатоксины примерно в 2 раза чище обычных. Стабильность антигенных свойств целлофановых анатоксинов при хранении несколько ниже, чем обычных. В опытах иммунизации мы-

шей и морских свинок, целлофановые анатоксины оказываются иммуногеннее обычных.

7. В процессе иммунизации мышей целлофановым ботулиническим анатоксином типа «А» имело место увеличение гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови. При иммунизации морских свинок наблюдалось возрастание гамма- и бета-глобулиновых фракций.

РОСТ И ТОКСИНООБРАЗОВАНИЕ *B. BOTULINUS* ТИПА А В ЦЕЛЛОФАНОВЫХ МЕШКАХ

Ю. З. Гендон

Из Государственного контрольного института сывороток и вакцин имени
Л. А. Тарасевича

(Поступила в редакцию 9/IX 1955 г.)

Получение активных высокоспецифических антигенов с минимальной примесью балластных веществ является одной из актуальнейших задач современной иммунологии. Это положение особенно относится к нативным бактериальным токсинам — фильтратам бульонных культур токсинообразующих бактерий, в которых, кроме активного начала, присутствуют разнообразные органические и минеральные вещества питательной среды и продукты метаболизма и автолиза бактерий. Очистка токсинов от балластных белков различными химическими методами может привести к разрушению или извлечению тех или иных компонентов (фракций), необходимых для выработки полноценного иммунитета. В связи с этим большого внимания заслуживает метод выращивания бактерий в целлофановых мешках, погруженных в жидкую питательную среду, позволяющий получать нативные концентрированные токсины, имеющие незначительную примесь балластных белковых веществ и быстро переходящие в анатоксины, которые во много раз превосходят по своим антигенным и иммуногенным свойствам обычные.

В 1946 г. Польсон и Стерн применили метод культивирования бактерий в целлофановых мешках при изготовлении токсина *B. botulinus* типа D. Полученный токсин вызывал гибель мышей в разведении 10^{-8} . Этот токсин быстро обезвреживался формалином, причем антигенные и иммуногенные свойства получавшегося анатоксина были значительно выше, чем обычного.

Стерн и Вентцель (1950) разработали метод получения в целлофановых мешках больших количеств ботулиновых токсинов типов С и D высоких титров, а также высокоиммуногенных анатоксинов для иммунизации крупного рогатого скота. Титры этих токсинов были в 100 раз выше для типа D и в 20 раз выше для типа С по сравнению с титрами токсинов, полученных обычными методами. При иммунизации морских свинок, а также крупного рогатого скота была выявлена значительно большая иммуногенная активность анатоксинов, полученных в целлофановых мешках, по сравнению с обычными. Этими авторами был предложен удобный способ укрепления целлофана, при котором целлофановую трубку выворачивали внутрь и оба конца ее укрепляли над средой. Это исключало возможность прохождения бактерий в окружающую целлофан питательную среду.

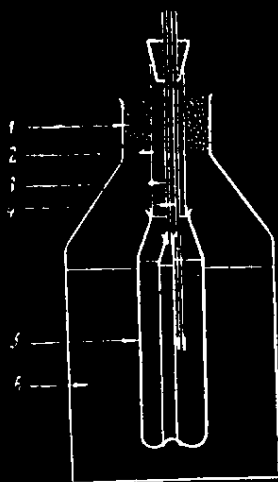
Барон и Рид (1954) получили в целлофановых мешках токсин *B. botulinus* типа E, содержащий 40 000 Dlm/мл для мыши, Гийоми с сотрудниками (1955) — токсин типа А с титром в 50 000—100 000 Dlm/мл, минимальная активная доза которого была меньше, чем у обычного, в 4 раза, Рейно с сотрудниками (1955) получил токсин типа А, который по количеству Dlm/мл был в 7 раз активнее обычного ($7 \cdot 10^5$ Dlm/мл).

Метод культивирования в целлофановых мешках применяется в настоящее время для получения высокоактивных токсинов ряда бактерий: *B. tetani* (Зелевинская и др., Кох и Каплан и др.), *B. oedematiens* (Борисоник, Зелевинская и др., Рейно), *B. perfringens* (Зелевинская и др., Стерн) и др. Получаемые при этом успешные данные побудили нас применить этот метод культивирования для получения высокоактивных токсинов и анатоксинов *B. botulinus* типа А.

Мы проводили исследования со штаммом *B. botulinus* типа А № 98. Питательной средой служил печеночный бульон с 1% глюкозы (рН=7,4).

Культивирование производили в 5-литровой бутылке (см. рисунок) с плотной ватно-марлевой пробкой (1), в которую была вмонтирована пробирка с обрезанным дном (2), закрытая резиновой пробкой с двумя отверстиями и укрепленными в них стеклянными трубками с ватными пробками (3, 4).

Бутылку стерилизовали в автоклаве при 120° в течение 30 минут. После охлаждения ватно-марлевую пробку вынимали и привязывали к ней вывороченную внутрь целлофановую трубку (5).



Схематический вид целлофановой системы.

Внутренний конец целлофановой трубки привязывали к резиновой манжетке, надетой на конец одной из стеклянных трубок таким образом, чтобы просвет этой стеклянной трубки (3) смотрел в питательную среду (через эту трубку можно добавлять в среду различные ингредиенты). Наружный конец целлофановой трубки привязывали к резиновой манжетке, надетой на конец стеклянной пробирки. В пространство между двумя стенками целлофановой трубки была проведена вторая стеклянная трубка (4) с надетой на конце резиновой манжеткой (эта трубка служила для наполнения целлофанового мешка физиологическим раствором, для засева культуры, а также для забора проб). Целлофан привязывали на 4—5 см выше уровня питательной среды (6).

После монтирования проверяли целостность целлофана. С этой целью весь мешок погружали в воду и в трубку, находящуюся между стенками мешка, нагнетали воздух. Пузырьки воздуха, проходящие через воду, указывали на имеющиеся в целлофане дефекты.

В 5-литровую бутылку мы наливали 4,5 л питательной среды, целлофановый мешок наполняли 450 мл физиологического раствора хлористого натрия и стерилизовали в автоклаве при 110° в течение 30 минут. После стерилизации систему оставляли на ночь в термостате для диффузии питательных ингредиентов среды через целлофановую мембрану внутрь мешка, после чего засевали 3—4 мл освеженной суточной культуры; резиновую и ватно-марлевую пробки заливали парафином и всю систему помещали в термостат (37°). Одновременно производили посев в бутылку с той же питательной средой, но без целлофана, служивший контролем.

Наши наблюдения показали, что в контрольных бутылках уже в первые сутки наблюдалось интенсивное помутнение среды за счет роста бактерий, увеличивавшееся в течение вторых-третьих суток, после чего кривая роста падала и бактерии оседали на дно. В целлофановых мешках рост был более равномерным: количество микробов постепенно увеличивалось с каждым днем и к пятым суткам содержимое мешков представляло собой густую массу бактериальных клеток. Количество микробных тел в 1 мл культур, выращенных в целлофановых мешках, на восьмые сутки (максимум токсинообразования) равнялось 4—5 млрд. микробных тел, в то время как в обычных культурах насчитывалось всего 500 млн. микробных тел в 1 мл.

В мазках как из контрольных бутылей, так и из целлофановых мешков в первые сутки обнаруживалось много хорошо окрашенных грамположительных палочек типичной морфологии. На 2—3-и сутки, кроме микробов обычной морфологии, наблюдались автолизированные бактерии, представлявшие собой грамотрицательные бледно окрашенные клеточки, которые выглядели как пустые клетки, но с сохранившейся и неспав-

щейся оболочкой, покрывающей прозрачное содержимое бактерий. Процессы автолиза в контрольных бутылках интенсивно нарастали и к пятым суткам достигали максимума, захватывая большинство клеток. В целлофановых мешках к пятым суткам наряду с автолизированными клетками, детритом и инволюционными формами имелось большое количество хорошо прокрашенных грамположительных бактерий. Процессы автолиза достигали в них максимума на восьмые сутки, однако и в это время имелось еще значительное количество грамположительных клеток.

Максимум токсинообразования в контрольных бутылках приходился на пятые сутки. Сила токсина к этому времени достигала 100 000, реже — 50 000 Dlm/мл. Токсины в целлофановых мешках содержали к этому времени 400 000—500 000 Dlm/мл. Максимум токсинообразования в целлофановых мешках приходился на восьмые сутки и титр токсинов в это время был равен обычно 2 000 000 реже 1 000 000 или 4 000 000 Dlm/мл. Таким образом, по количеству Dlm/мл они оказались в 20 раз сильнее токсинов, получаемых при обычном методе культивирования.

Питательная среда вокруг целлофановых мешков не содержала токсина, о чем свидетельствовала ее безвредность для мышей (при введении 0,5 мл внутривенно или 1 мл внутрибрюшинно).

Ко времени максимума токсинообразования pH контрольных токсинов равнялся 5,8, pH токсинов в целлофановых мешках — 7,0; такой же pH был у питательной среды, окружавшей целлофановые мешки.

Контрольные токсины содержали от 100 до 250 опытных доз в 1 мл, в целлофановых мешках — от 2000 до 5000 опытных доз в 1 мл, т. е. они были в 15—20 раз активнее обычных токсинов.

В реакции коагуляции токсины и анатоксины, полученные при культивировании в целлофановых мешках, давали 12—18 колец, в то время как обычные — только 1—2 кольца.

Они флокулировали через 30—50 минут, в то время как у обычных не удалось наблюдать флокуляции при идентичных условиях опыта.

В обычных токсинах имелось 310—325 мг% общего и 130—140 мг% аминного азота, в то время как токсины, полученные в целлофановых мешках, содержали 160—170 мг% общего и 65—70 мг% аминного азота. Таким образом, по содержанию общего и аминного азота последние были вдвое чище токсинов, получаемых при обычном методе культивирования. На одну минимальную смертельную дозу обычного токсина приходилось 0,0032 мг азота, а на одну минимальную смертельную дозу токсина из целлофанового мешка — всего 0,000085 мг азота, т. е. по количеству миллиграммов азота на Dlm он был в 37 раз чище обычного. На 1 мг азота приходилось 300—330 Dlm обычного токсина и около 12 000 Dlm токсина, полученного в целлофановом мешке, который, таким образом, был в 35—40 раз активнее обычного.

При засеве культуры в целлофановый мешок, содержащий 450 мл физиологического раствора, выход токсина составлял 325—350 мл. Если считать, что в 4500 мл питательной среды при использовании ее в обычных условиях культивирования содержится 450 000 000 Dlm/мл (при максимуме токсинообразования в 100 000 Dlm/мл), а в 350 мл токсина, получаемого при культивировании в целлофановом мешке, из того же количества питательной среды (с максимумом токсинообразования в 2 000 000 Dlm/мл) — 700 000 000 Dlm/мл, становится ясным, что культивирование в целлофановых мешках обеспечивает почти двойную экономию среды.

Токсины из целлофановых мешков быстрее обезвреживались формалином, несмотря на то, что содержание в них специфического токсического начала было значительно выше, чем в обычных. Так, добавление 0,4% формалина переводило обычные токсины в анатоксины за 33—35 суток при температуре 37°, в то время как для обезвреживания цельного токсина, полученного в целлофановом мешке, достаточно было 25 суток.

Подобное явление можно объяснить наличием в обычном токсине больших количеств неспецифических белковых веществ, которые инактивировали часть формалина, что вело к удлинению времени, необходимого для обезвреживания токсина. При этом следует учесть, что удлинение времени перехода токсина в анатоксин может повести к ухудшению антигенных свойств последнего.

Антигенные свойства анатоксинов мы определяли при помощи реакции антитоксинсвязывания. Анатоксины из целлофановых мешков содержали 350—450 антитоксинсвязывающих единиц в 1 мл, в то время как обычные анатоксины — только 40—60 единиц. Таким образом, антигенные свойства их были в 6—10 раз выше, чем у обычных. Предварительные опыты иммунизации морских свинок показали, что они значительно превышали обычные анатоксины и по иммуногенности.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что культивирование *B. botulinus* в целлофановых мешках, будучи методически несложным, является в то же время исключительно эффективным как для повышения токсинообразования, так и для увеличения интенсивности роста бактерий.

Выводы

1. Культивирование в целлофановых мешках позволило получать токсин *B. botulinus* типа А, который по количеству Dlm и опытных доз на 1 мл был в 20 раз активнее обычного, а общего и аминного азота содержал вдвое меньше, чем обычный.
2. Анатоксины после обезвреживания 0,4% формалином токсинов, полученных в целлофановых мешках, обладали высокими антигенными и иммуногенными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

- Зелевинская С. А., Акимов В. В., Гильгут Е. А. и др., в кн.: Тезисы докл. на научной межинститутской конференции по проблеме «Научные основы производства вакцин и сывороток», М., 1954, стр. 19—20. — Barron A., Reed Y., Canad. J. Microbiol., 1954, S. 1, p. 108—117. — Fredette K., Vinet J., Canad. J. med. Sci., 1952, v. 30, p. 155—156. — Guillemin M., Kréguier A., Geaffroy M., An. Inst. Past., 1955, t. 88, p. 44—59. — Koch W., Kaplan D., J. Immunol., 1953, v. 70, p. 1—5. — Polson A., Sterne M., Nature, 1946, v. 158, p. 238—239. — Raynaud M., Turpin A., Mangalo R., Bizzini B., An. Inst. Past., 1955, v. 88, p. 24—43. — Sterne M., в кн.: Riassunti delle comunizinni Vi congresso internazionale dimicrobiologie, Roma, 1953, v. 2, S. 8—16, N. 404—796, p. 285—286. — Sterne M., Wentzel L., J. Immunol., 1950, v. 65, p. 175—183. — Wintrel L., Sterne M., Science, 1949, v. 110, p. 259—259.